

508,784

## (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2003年10月2日 (02.10.2003)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 03/080814 A1

(51)国際特許分類7: C12N 1/20

(21)国際出願番号: PCT/JP03/03332

(22)国際出願日: 2003年3月19日 (19.03.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:  
特願2002-87215 2002年3月26日 (26.03.2002) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 有限会社新世紀発酵研究所 (NEW CENTURY FERMENTATION RESEARCH, LTD.) [JP/JP]; 〒819-0002 福岡県福岡市西区姪浜1丁目10番1-611 Fukuoka (JP). 三和酒類株式会社 (SANWA SHURUI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒879-0495 大分県宇佐市大字山本2231-1 Oita (JP). 株式会社大麦発酵研究所 (BARLEY FERMENTATION TECHNOLOGIES, INC.) [JP/JP]; 〒879-0467 大分県宇佐市大字山本2211 Oita (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 石崎文彬 (ISHIZAKI,Ayaaki) [JP/JP]; 〒819-0002 福岡県福岡市西区姪浜1丁目10番1-611 Fukuoka (JP). 大森俊郎 (OMORI,Toshiro) [JP/JP]; 〒879-0467 大分県宇佐市大字山本2211 株式会社大麦発酵研究所内 Oita (JP). 古田吉史 (FURUTA,Yoshifumi) [JP/JP];

〒879-0495 大分県宇佐市大字山本2231-1 三和酒類株式会社内 Oita (JP). 梅本泰史 (UMEMOTO,Yasufumi) [JP/JP]; 〒879-0495 大分県宇佐市大字山本2231-1 三和酒類株式会社内 Oita (JP).

(74)代理人: 西澤利夫 (NISHIZAWA,Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。



A1

(54)Title: METHOD OF CONTINUOUS CULTURE OF ANAEROBIC BACTERIUM

WO 03/080814

(54)発明の名称: 嫌気性菌の連続培養法

(57)Abstract: In a continuous fermentation system whereby an organic acid or an alcohol is continuously produced with the use of an aerobic bacterium, a substrate is fed based on the cumulative consumption (expressed in mole number) of an alkali added to regulate the pH value of the liquid culture medium at a constant level to thereby regulate the concentration of saccharides remaining in the liquid culture medium at a constant level.

(57)要約: 嫌気性細菌を用いて連続的に有機酸やアルコールを生産する連続発酵システムにおいて、培養液pHを一定に制御するために添加するアルカリの積算消費モル数を基準として基質をフィードすることによって、培養液の残糖濃度を一定に制御する。

## 明細書

### 嫌気性菌の連続培養法

#### 5 技術分野

この出願の発明は、嫌気性菌の連続培養法に関するものである。

#### 背景技術

嫌気性細菌の中には、アセトン・ブタノール菌、乳酸菌、エタノール生産細菌など、産業的に有用な細菌が多く存在するが、これら嫌気性細菌を用いた実用に耐える効率高い工業プロセスは全く知られていない。たとえばアセトン・ブタノール発酵は、近代発酵工業の祖として、先の大戦までは世界各国で盛んに実施されたが、石油化学の勃興とともに現在では完全に消滅している。また、乳酸菌は乳加工や発酵乳の製造、醸造、漬け物製造などに広く用いられている有用細菌であるが、有機酸工業としての乳酸発酵技術は、好気性細菌による近代的発酵工業であるグルタミン酸発酵に代表されるアミノ酸・核酸発酵に比べ、ほとんどまだ未着手の状態にある。そして、嫌気性細菌によるエタノール生産は酵母に比べ生産性が高いことはわかっているが、包括固定化法による連続発酵法が検討されているものの、今まで実用に耐えるプロセスの開発には成功していない。しかるに、最近石油資源の枯渇への懸念から要請される化石燃料依存からの脱却、炭酸ガス削減への対応、プラスチックゴミ問題など、深刻化するグローバル課題への対応技術として、嫌気性細菌活用の期待が急速に高まっている。特に、生分解性プラスチックとして市場拡大が期待されているポリ乳酸の原料供給手段としての有機酸工業としての乳酸発酵や、安全なジーゼル油添加剤として需要が拡大している発酵エタノールの生産性向上は緊急の技術開発課題となっている。だが、*Lactobacillus* や *Lactococcus* を用いる乳酸発酵や、*Zymomonas* を用いるエタノール発酵では、工業化が可能な

連続発酵技術は確立していないのが実情である。従来、これら嫌気性菌の連続発酵については、学術論文による報告例は多数にのぼるが、いずれも単純なケモスタッフを基本とするもので、瞬間的な生産性は必ずしも低くはないが、システム制御法が確立していないため発酵速度を長時間にわたって安定に維持することはできず、そのため基質消費速度が不安定で、その結果発酵槽内の基質濃度（残糖濃度）を制御することができていない。  
すなわち、実用性のほど遠いものとなっている。

周知のとおり、工業用の連続発酵システムでは、定常状態を長時間維持できなければならない。すなわち、基質消費速度を一定に保ち、しかも流出液（生産物回収を目的とする）の基質濃度を極力低く一定に保ち、原料ロスを最小にしなければならない。好気性菌の連続培養法では、そのために DO-stat と呼ばれる大変優れた方法がある。

この方法では、基質濃度が低い限界値に達すると、代謝活性が低下して酸素消費速度が低下する結果、酸素接種量が低下して溶存酸素濃度 (DO) が上昇する。そこが基質切れのシグナルと判断して基質を追加補填してやれば、発酵は回復し継続する。

しかしながら、嫌気性菌の場合には、元来酸素を消費しないので、原理的にこの方法を採用することはできない。また、好気性菌の連続培養法には、DO に代わって pH の上昇を基質切れのシグナルに用いる pH-auxostat が用いられることがある。嫌気性菌でも、酸の生成に限られずにアルコール生成でも、代謝に伴い pH が低下するので、pH の反転上昇を基質切れのシグナルと見なして、これを基質フィードタイミングとすることが可能のように思える。しかし、実際にこの方法で基質フィードを行うことはできない。それは、嫌気性菌では pH の反転上昇が起こると直ちに菌が失活し、発酵速度は不可逆的に低下してもはや快復しないからである。すなわち、図 1 に示すように、嫌気性菌の培養で、pH が下限界に近づいたとき (A) は、残糖濃度が臨界値 (critical value) に近づくが、臨界値に達した時点で直ちに糖液をフィードすれば (B) 発酵は継続できるが、図 2 に示すように、

臨界値に達しても糖液をフィードせず放置した場合は菌は失活し、発酵速度は低下して運転を継続できない。これは、嫌気性菌に共通する好気性菌とは異なる特徴である。従って、嫌気性菌では連続培養を実施するための基質フィードの適当な手段が見出されていない。

5 もう一つの嫌気性菌の特徴は、発明者が *sterile cell* と定義した増殖能力を失った細胞の生成である。このため、嫌気性菌の増殖は菌濃度が頭打ちとなり、回分培養では菌濃度は低くとどまる。発酵速度を上昇させるには、菌濃度の増加が有効で、*cell recycling* 法によって培養液の濃縮が可能であるが、細胞濃度の上昇に伴い、生産物濃度が上昇して、最終生産  
10 物阻害が強くなる。このようなことから、*cell recycling* 法による菌濃縮培養法は最終生産物阻害による菌の活性低下を招く結果、発酵は不安定となり、著しい生産性の低下をまねく。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの問題点を解消し、乳酸菌を用いて高純度 L-乳酸を生産する有機酸生産プロセスや嫌気性細菌を用いる燃料用エタノール生産など、高い経済効率で運転しなければ成り立たない嫌気性菌の連続発酵プロセスの実用化に欠くことのできない新しい制御法として、残糖制御の方法と最終生産物阻害の軽減と菌の活性維持の新しい方法を提供することを課題としている。

## 20 発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第 1 には、嫌気性菌を培養する発酵槽の菌濃度を一定に制御する培養法において、基質およびアルカリを交互にフィードするとき、時間当たりのアルカリ消費量を基準として基質をフィードすることによって培養液の残糖濃度を制御することを特徴とする嫌気性菌の連続培養法を提供する。

第 2 には、培養液 pH を一定に制御するために添加するアルカリの積算消費モル数に比例したモル数の基質をフィードし、残糖濃度を一定とする連続培養法を、第 3 には、アルカリの濃度を低くすることで循環培養液の

希釈効果を高めて、菌の比活性を維持して高い生産性を維持することを特徴とする連続培養法を提供する。

以上のとおりのこの出願の発明は、発明者による以下のとおりの検討を踏まえている。

5 すなわち、まず残糖レベルを一定に制御するために、従来は培養液基質レベルの低下を直接検出してフィードバック制御を行うことを考えてきたが、対象とする培養にこの目的で使用できる信号が見あたらないことから、pH 調整のためのアルカリフィード量の積算値から基質消費量を求め、この値から追加する基質量を求めて、所定量の基質を培養液に添加すれば、  
10 結果として残糖濃度を一定に保つことができるを見出した。そして、さらには、この方法を実現し、しかも大きな生産性を得るには、菌の高密度培養が必要とされ、そのような条件下では強い最終生産物阻害が発現し、菌の失活が起こる結果、菌の活性（菌体重量当たりの代謝活性＝比速度）が一定せず、結果として上記方法で残糖制御を行うことが難しくなるが、  
15 濁度制御によって菌濃度を一定に保つ培養系で、菌濃度の増加に対応して中和剤アルカリの濃度を希釈することで希釈効果を大きくすれば、生産物濃度が低下して阻害が低減する結果、安定した菌の比活性を維持できて、上記の方法による残糖制御が行えるを見出した。

この出願の発明は以上のような知見に基づいて完成されたものである。

20 この出願の発明によって、残糖濃度を低く制御して原料ロスを最低限に抑えることができる嫌気性菌連続発酵プロセスが可能とされ、さらには、残糖濃度を低く抑えられることから、最終製品の乳酸等の純度を飛躍的に向上することができる。

## 25 図面の簡単な説明

図 1 は、嫌気性菌の培養で、pH が下限界に近づいたとき (A) は、残糖濃度が臨界値 (critical value) に近づくが、臨界値に達した時点で直ちに糖液をフィードした場合 (B) は発酵を継続することができることを示した模

式図である。

図2は、臨界値に達しても糖液をフィードせず放置した場合は、菌は失活し、発酵は継続できないことを示した模式図である。

図3は、この発明のための装置構成を例示した概要構成図である。

5

### 発明を実施するための最良の形態

この出願の発明では、以上のように、嫌気性菌を培養する発酵槽の菌濃度を一定に制御する培養システムにおいて、基質およびアルカリを交互に連続的にフィードするときに、時間当たりのアルカリ消費量を基準として、  
10 たとえばこれに一定の係数を乗じたモル量に等しい基質のグラム等量をフィードすることによって培養液の残糖濃度を制御する。これによって、連続発酵による基質ロスを最小限度に抑え、生産コストを引き下げるとともに、製品の品質を向上できる。

また、この出願の発明では、上記の培養システムにおいて、培養液を循環して培養液菌濃度を上昇させると、生産物濃度も増加するので、生産物阻害によって菌の活性が低下するが、アルカリの濃度を低くすることで希釈効果を高めて、菌の比活性を維持して高い生産性を維持することを可能とする。このことで、菌の比活性が安定して保たれ、この出願の発明の嫌気性菌の連続培養の実施が可能となる。

20 以下、本発明の実施の形態について、図を用いて説明する。

図3はこの出願の発明を実施するのに好適な培養システムを示したSFD (Schematic Flow Diagram) である。図中において、Aは発酵槽、Bは菌濃縮用クロスフローろ過器、CはpH測定制御器、Dはアルカリ添加量積算器、Eはレーザー濁度測定制御器、 $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$ はペリスターポンプを示している。 $F_1$ はpH制御のためのアルカリフィード速度、 $F_2$ はアルカリ添加量から求められる基質フィード速度、 $F_3$ は濁度制御のために添加される糖を含まない栄養成分培地のフィード速度、 $F_4$ は $F_1$ に等量の培養ろ液引き抜き速度 (Cによるフィードバック制御)、 $F_5$ は $F_2$ に等量の培養ろ液引き抜き

速度 (D) によるフィードバック制御)、 $F_5$  は  $F_3$  に等量の培養液引き抜き速度 (E によるフィードバック制御) を示している。なお、速度はいずれも (ml/min) とする。この制御システムでは、発酵槽 A の液量 V を一定に保つために、 $F_1=F_4$ 、 $F_2=F_5$ 、また、V 一定で発酵槽 A 内の菌濃度を一定に保つために  $F_3=F_6$  なる条件を満足させている。このシステムでは、流入量の総量は  $F_1+F_2+F_3$ 、流出量の総量は  $F_4+F_5+F_6$  で、 $F_1+F_2+F_3=F_4+F_5+F_6$  の関係にあるから、発酵槽流量を V とすると、連続発酵の希釈率は次式 (1)

$$D (\text{Total dilution rate}) = \frac{F_1 + F_2 + F_3}{V} = \frac{F_4 + F_5 + F_6}{V} \quad (1)$$

10

で示される。また、発酵槽内の菌増殖量  $\mu XV$  と引き抜き量  $XF_6$  は等しくなければならぬから、菌の比増殖速度は  $XF_6=\mu XV$  の関係があって、次式 (2)

15

$$\mu = \frac{F_6}{V} \quad (2)$$

となって、増殖速度  $\mu$  が希釈率 D に等しい状態で定常状態が成立するとする従来の連続発酵の原則  $\mu=D$  に従わない、全く新しい連続発酵であることがわかる。上記の式で、基質フィード速度は  $F_1$  の関数として与えられる。

20 また  $F_1$  は低規定度にすれば大きくなるので、D が大となって希釈効果が得られる。このようにして、最終生産物阻害が低減され、菌の比活性を高く維持するとともに、残糖濃度を一定に制御できる。

そこで以下に実施例を示し、さらに詳しく説明する。もちろん、以下の例によって発明が限定されることはない。

25

### 実 施 例

#### (実施例 1)

使用菌は発明者が独自に分離した Lactococcus lactis IO-1 (JCM7638) を

使用した。種菌は-85℃の凍結保存菌を TGC 培地 (Difco) に植菌し静置培養したものを用いた。これをグルコース 3%、酵母エキス 0.5%、ポリペプトン 0.5%、NaCl 1%からなる培地 100ml を Erlenmyer Flask に分注して 120℃、5 分間 autoclave 滅菌したものに接種して 8 時間培養したものをシードとした。乳酸発酵に用いた培養装置のシステム構成は図 2 に示したものと同一である。主発酵培地はグルコース 5%、酵母エキス 0.5%、ポリペプトン 0.5%、NaCl 1%で、殺菌条件は同一である。主発酵槽は全容 1 リッターのガラス製ジャーで、内部にマグネットスターラーの攪拌機を設置し、約 400rpm の回転数でゆっくり攪拌している。ジャー全体を water bath に浸け、37℃の温水を循環して培養温度を 37℃に制御した。ジャーに pH 測定用複合ガラス電極を装着し、pH meter (東亜電波製) で測定し、pH 6.0 (下限) でアルカリ (1N-NaOH) をフィードして pH 制御を行った。グルコースアナライザーで培地の残糖濃度を適時測定し、残糖レベルが 3g/l となつた時点でアルカリフィード速度に比例して求めたグルコースフィード速度で培地の添加を行い、連続発酵を開始した。そのときのアルカリフィード速度とグルコースフィード速度との関係については、次のように考慮される。

すなわち、グルコース必要量 ( $G_q$ ) は次式 (3) で表される。

$$G_q = \frac{f F_1 \times 90}{0.95} + C \text{ g/l h} \quad (3)$$

(ただし、f は 1N-NaOH の規定度 factor、C は残糖誤差補正項)

すなわち、1N のアルカリのフィード速度  $F_1$  に対応する乳酸のグラム数 (乳酸の分子量は 90) が必要なグルコース量 (グラム数) となるが、さらにフィードしたグルコースの 5%は  $F_2$  の再生に使用されるので 0.95 で割る必要がある。また、実際の制御では多少 off-set (制御偏差) を生じるので、その修正項 C を加えて補正する。

従って、糖濃度 Sg/l のフィード液を用いて式 (3) で得られた糖量を

供給す

るには、培地添加速度は、次式（4）で表される。

$$F_2 = \frac{G_Q}{1,000 \times S} \quad l/h \quad (4)$$

5

(ただし、S は培地 (フィード液) 糖濃度)

培地フィード槽に主発酵と同一組成の培地を送り仕込んでおき、この計算によって求めた量をフィードしながら連続培養を行った。連続培養を実施するにあたり、ジャーから培養液を抜き出し、cross flow 型限外ろ過膜

10 (MICROZAPSP103、旭化成) を用いて培養液を循環し、微生物の濃縮を行つたろ過膜外側からは除菌液を抜き出して、製品である乳酸液を取り出す。また、ジャーにはプロセスオンライン濁度計プローブを設置し、その出力を DDC controller (ModelLA-300 エーエスアール) に入力し、ジャーの濁度制御を行つて、菌の濃縮管理を行うシステムも組み込んだ。濁度コントロールのシステムとしては、培養液（含菌液）を抜き出し、無糖培地（酵母エキス 0.5%、ポリペプトン 0.5%、NaCl 1%からなる培地）を希釈水としてフィードした。これらはペリスタリックポンプによって同調させた。かくして、連続培養では、3 種類の液 ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ) を供給し、2 種類の液 ( $F_4$ ,  $F_5$  と  $F_6$ ) の抜き出しを行う。すなわち、pH 制御のためのアルカリ液 (1N-NaOH) の添加量の積算値に対応した基質の糖をフィードした。

回分培養で発酵を開始して約 12 時間後、残糖レベルが約 3g/l となったところで、連続フィードと菌のリサイクルを開始したところ、菌の濃度増加とともに基質フィード速度も徐々に増加して、菌体濃度 10.5g/l (DCW として) に達した。このとき、糖濃度は目標の 2g/l より高い 4.5g/l であったので、前記の残糖誤差補正項 C によって残糖レベルを修正したところ、約 3 時間で残糖 2±0.5g/l に制御できた。それ以降 total dilution rate 0.7 1/h で 10 日約 250h の連続運転を行い、残糖レベルを安定して維持でき、L-乳酸濃度は平均 45g/l であった。従って、このシステムの生産性は

31.5g/l h であった。

この乳酸を濃縮し 90% L-乳酸液としたところ、混在する糖は対乳酸 5% 以下であり、ポリ乳酸原料として十分の品質であった。

(実施例 2)

- 5 使用菌は発明者が独自に分離した *Lactococcus lactis* I0-1 (JCM7638) を使用した。種菌は -85°C の凍結保存菌を TGC 培地 (Difco) に植菌し静置培養したものを用いた。これをグルコース 3%、酵母エキス 0.5%、ポリペプトン 0.5%、NaCl 1 % からなる培地 100ml を Erlenmyer Flask に分注して 120°C で 5 分間、autoclave 滅菌したものに接種して 8 時間培養したものと  
10 シードとした。用いた培養装置のシステム構成は実施例 1 に示したものと同一である。主発酵槽は全容 1 リッターのガラス製ジャーで、内部にマグネットスターの攪拌機を設置し約 400 rpm の回転数でゆっくり攪拌している。ジャー全体を water bath に浸け、37°C の温水を循環して培養温度を 37°C に制御した。ジャーに pH 測定用複合ガラス電極を装着し、pH  
15 meter (東亜電波製) で測定し、pH 6.0 (下限) でアルカリ (1N-NaOH) をフィールして pH 制御を行った。主発酵に用いた培地は、コーンスターチ酵素糖化液 (使用酵素 NOVO Thermamyl 120L、Dextrozyme 225/75L) を希釈してグルコース 5% に調整し、これにコーンスティーピリカ (CSL) 1% を添加し、pH 調整後 120°C で 5 分間、殺菌したものである。グルコースアナライザで培地の残糖濃度を適時測定し、残糖レベルが 1.5g/l となった時点でアルカリフィード速度に比例して求めたグルコースフィード速度で培地の添加を行い、連続発酵を開始した。そのときのアルカリフィード速度とグルコースフィード速度との関係は実施例 1 において用いた式によ  
20 りて求めた。  
25 この計算によって、コンピューターから培地フィード槽に指令を送り、糖をフィードしながら連続培養に移行した。連続培養を実施するにあたり、ジャーから培養液を抜き出し、cross flow 型限外ろ過膜 (MICROZAPSP103、旭化成) を用いて培養液を循環し、微生物の濃縮を行ったろ過膜外側から

は除菌液を抜き出して、製品である乳酸液を取り出す。また、ジャーにはプロセスオンライン濁度計プローブを設置し、その出力を DDC controller (ModelLA-300 エーエスアール) に入力し、ジャーの濁度制御を行って、菌の濃縮管理を行うシステムも組み込んだ。濁度コントロールの  
5 システムとしては、培養液（含菌液）を抜き出し、無糖培地（CSL 1%）を水に溶解し、殺菌したもの）を希釈水としてフィードした。これらはペリ  
スタリックポンプによって同調させた。かくして連続培養では、3種類  
の液 ( $F_1$ 、 $F_2$ 、 $F_3$ ) を供給し、2種類の液 ( $F_4$ 、 $F_5$  と  $F_6$ ) の抜き出しを行う。す  
なわち、pH 制御のためのアルカリ液 (0.5N-NaOH) の添加量の積算値に対応  
10 した基質の糖をフィードした。

回分培養で発酵を開始して約 18 時間後、残糖レベルが約 1.5g/l となっ  
たところで、連続フィードと菌のリサイクルを開始したところ、菌の濃度  
増加とともに基質フィード速度も徐々に増加して、菌体濃度 12.3g/l (DCW  
として) に達した。このとき、糖濃度は目標の 1.5g/l より低い 1.0g/l で  
15 あったので、補正項 C によって残糖レベルを修正したところ、約 1 時間で  
残糖  $1.5 \pm 0.2$  g/l に制御できた。それ以降 total dilution rate 1.0 l/h  
で 3 週間約 525h の連続運転を行い、残糖レベルを安定して維持でき、L-  
乳酸濃度平均値は 40.5g/l であった。従って、このシステムの生産性は  
40.5g/l h であった。

20 この乳酸を濃縮し 90% L-乳酸液としたところ、混在する糖は対乳酸 5%  
以下であり、ポリ乳酸、原料として十分の品質であった。

### (実施例 3)

使用菌は Zymomonas mobilis NRRLB-14023 である。種菌は-85°C の凍結  
保存菌を YM 培地に植菌し静置培養したものを用いた。これをグルコース  
25 100g、酵母エキス 10g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{Mg}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g を  
1 l の脱イオン水に溶解した培地 100ml を Erlenmyer Flask に分注して  
120°C で 5 分、autoclave 滅菌したのに接種して、約 8 時間培養したものを  
シードとした。エタノールの攪拌発酵に用いた培養装置のシステム構成

は図2に示すものと同じである。すなわち、主発酵槽は全容約1リッターのガラス製ジャーで、内部マグネットスターラーの攪拌機を設置し約400rpmの回転数でゆっくり攪拌している。ジャー全体をwater bathに浸け、37℃の温水を循環して温度を制御する。ジャーにpH測定用複合ガラス電極を装着し、pH meter（東亜電波製）で測定し、下限の2点制御を行った。連続運転に入れば、pH上限で基質フィードを行い、pH下限(5.5)でアルカリ(0.5N-NaOH)フィードを行った。また、ジャーにはプロセスオンライン濁度計プローブを設置し、その出力をDDC controller(ModelLA-300エーエスアール)に入力、ジャーの濁度制御を行うシステムを構築した。

10 ジャーから培養液を抜き出し、cross flow型限外ろ過膜(MICROZAPSP103、旭化成)を用いて培養液を循環し、菌の濃縮を行うとともに、ろ過膜外側から除菌液を抜き出してエタノールを含む液を取り出す。一方、濁度コントロールのシステムとしては、殺酸した無糖培地をフィードし、培養液(含菌液)を抜き出した。このとき、水の供給と培養液の抜き出しはペリスタリックポンプによって同調させた。連結培養では、実施例1と同様、3種類の液を供給し、2種類の液の抜き出しを行う。すなわち、pH下限においてpH制御のためのアルカリ液(0.5N-NaOH)を添加し、実施例1に示した計算式に代わって、次式(5)

$$20 \quad G_Q = \frac{f_F f_H \times 180}{0.95} + C \quad g/l \cdot h \quad (5)$$

(ただし、 $f_H$ はグルコース1モルの取り込みに要する1N-NaOH量の逆数)によって計算した糖フィード速度で培地をフィードする。エタノール発酵は乳酸発酵とは異なりグルコースからエタノールを生成するときにCO<sub>2</sub>の発生があって、収率は100%とならず、通常は50%である。

そこで、グルコースからエタノールの転換率を $f_E$ と表せば、式(1)と同様の考えによって式(5)が成立することになる。

フィード液とアルカリ液をジャーに供給するとき、ペリスタリックポンプによって等量の除菌液を限外ろ過膜外側から抜き出してジャーの液量を一定に保つ。また濁度制御のために、上述したように、培養液を抜き出し、これもジャーの液量を一定に保つように無糖培地をペリスタティックポンプを用いて供給する。主発酵はシードと同一組成、すなわちグルコース 10%、酵母エキス 1%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%、 $\text{Mg}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05g の培地 400ml にシード 20ml を植菌してスタートしアルカリフィードしながら pH5.5 を維持する。

回分培養開始約 8 時間後、培地の残糖濃度が 1g/l に近づいたところで、

連続基質フィードと菌のリサイクルを開始した。菌の濃度増加とともに基質フィード速度も徐々に増加して、菌体濃度 7.5g/l (DCW として) に達した。このとき、残糖濃度は目標の 1g/l より高い 1.5g/l であったので、補正項 C によって残糖レベルを修正したところ、約 2 時間で残糖 1.0 ± 0.3g/l に制御できた。それ以降 total dilution rate 0.5l/h で 7 日約 150h の連続運転を行い、残糖レベルを安定して維持でき、この間のエタノール濃度 52g/l であった。従って、このシステムのエタノール生産性は 26g/l h であった。

### 産業上の利用可能性

この出願の発明では、菌体を固定化しないで微生物の代謝活性を生菌体として維持し、活性の衰えた菌は wash out させると共に、新しい菌を再生させる。このようにして、発酵システムの中は一定の代謝活性を有する菌のみで構成されるバイオリアクターが成立する。このようなリアクターでは、濁度制御によって微生物濃度を一定に維持すれば、発酵速度は一定となるので、基質を連続的にフィードして、その速度に対応した速度で生産物を引き抜く連続発酵システムとなる。このとき、希釀率は、アルカリ液を含むフィード液の容積によって決まるので、たとえば、アルカリ濃度を下げれば、希釀率が大きくなり、最終生産物阻害を低減できる。従って、

菌濃度を高くして最終生産物濃度が高くなれば、アルカリ濃度を下げて、希釀率を上げれば最終生産物阻害を低減でき、高い生産速度を維持できる。このようなバイオリアクターは今までに全く知られていなかったバイオリアクターである。このようなリアクターは反応速度が石油化学の連続  
5 反応に近いものとなるので、従来の回分発酵に比べ、数十倍の装置生産性が得られる。

## 請求の範囲

1. 嫌気性菌を培養する発酵槽の菌濃度を一定に制御する培養法において、基質およびアルカリを交互にフィードするとき、時間当たりのアルカリ消費量を基準として基質をフィードすることによって培養液の残糖濃度を制御することを特徴とする嫌気性菌の連続培養法。
- 5 2. 培養液 pH を一定に制御するために添加するアルカリの積算消費モル数に比例したモル数の基質をフィードし、残糖濃度を一定とすることを特徴著とする請求項 1 の嫌気性菌の連続培養法。
- 10 3. 請求項 1 または 2 の培養法において、アルカリの濃度を低くすることで循環培養液の希釈効果を高めて、菌の比活性を維持して高い生産性を維持することを特徴とする嫌気性菌の連続培養法。

図 1

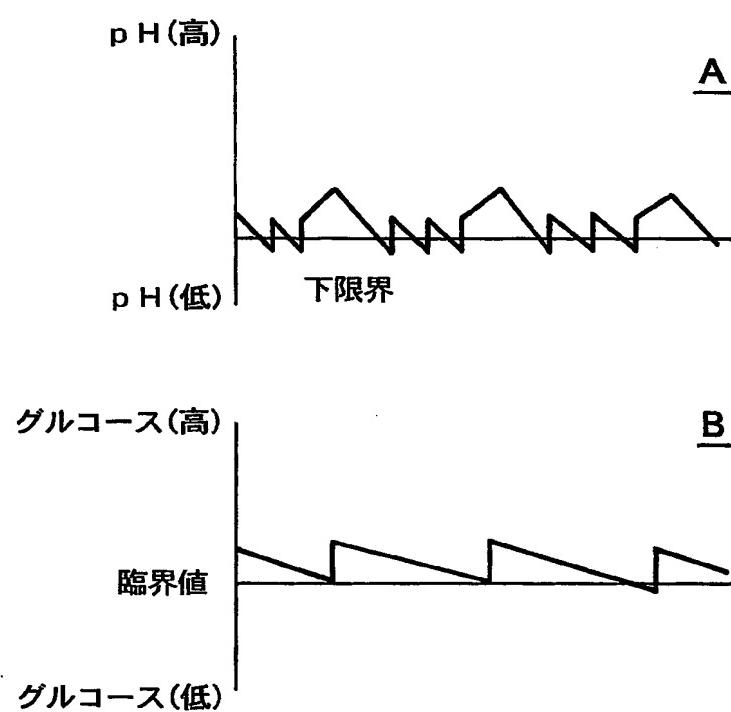


図 2

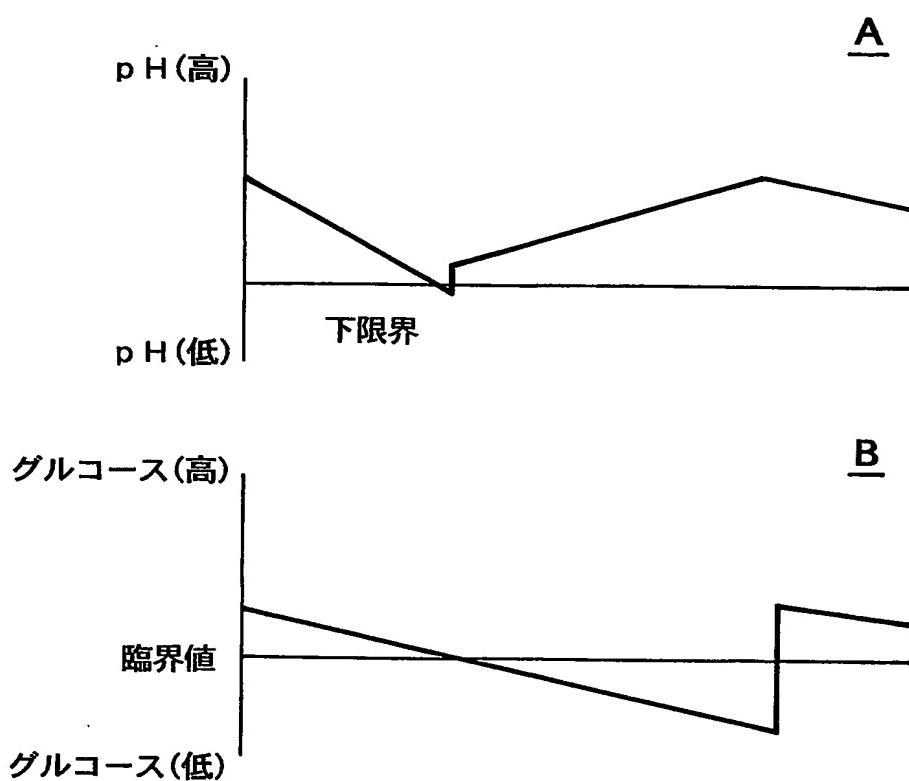
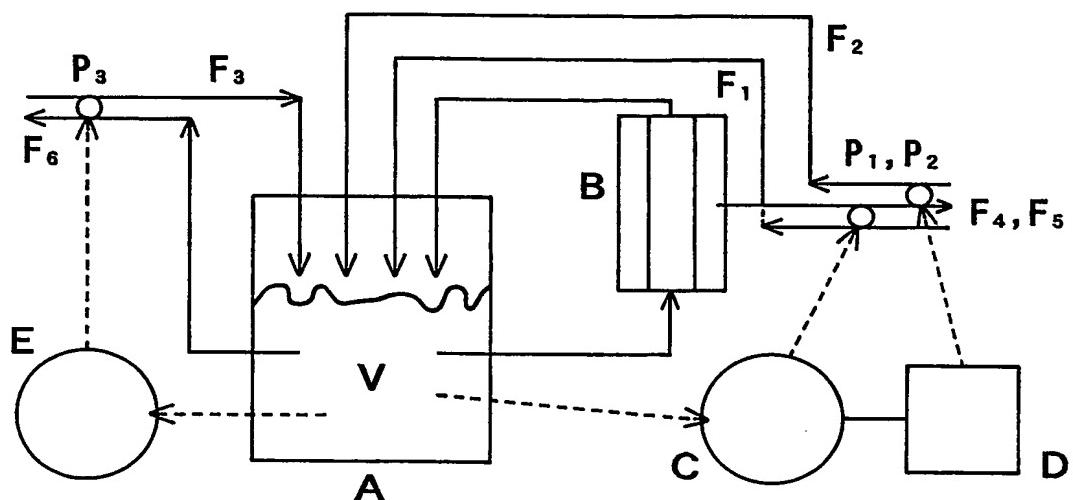


図 3



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/00-1/38, C12M1/00-1/42, C12P7/06, C12P7/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 58-98085 A (Hitachi, Ltd.), 10 June, 1983 (10.06.83), (Family: none)	1-3
Y	JP 53-75033 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 04 July, 1978 (04.07.78), (Family: none)	1-3
Y	JP 7-177876 A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 18 July, 1995 (18.07.95), (Family: none)	1-3
A	JP 9-65873 A (Oriental Yeast Co., Ltd.), 11 March, 1997 (11.03.97), (Family: none)	1-3

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 April, 2003 (24.04.03)Date of mailing of the international search report  
13 May, 2003 (13.05.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03332

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 458370 A (Daicel Chemical Industries), 27 November, 1991 (27.11.91), & DE 3650395 A & JP 61-293388 A & US 5466588 A	1-3
A	JP 61-124374 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 12 June, 1986 (12.06.86), (Family: none)	1-3
A	JP 8-252088 A (Nippoh Chemicals Co., Ltd.), 01 October, 1996 (01.10.96), (Family: none)	1-3

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C1. 7 C12N 1/20

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C1. 7 C12N 1/00 - 1/38, C12M 1/00 - 1/42  
C12P 7/06, C12P 7/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 58-98085 A(株式会社日立製作所) 1983.06.10 (ファミリーなし)	1-3
Y	JP 53-75033 A(松下電器産業株式会社) 1978.07.04 (ファミリーなし)	1-3
Y	JP 7-177876 A(株式会社ヤクルト本社) 1995.07.18 (ファミリーなし)	1-3
A	JP 9-65873 A(オリエンタル酵母工業株式会社) 1997.03.11 (ファミリーなし)	1-3

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.04.03

国際調査報告の発送日

13.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

長井 啓子



4 N 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 458370 A(Daicel Chemical Industries)1991.11.27 & DE 3650395 A & JP 61-293388 A & US 5466588 A	1 - 3
A	JP 61-124374 A(松下電器産業株式会社)1986.06.12 (ファミリーな し)	1 - 3
A	JP 8-252088 A(日宝化学株式会社)1996.10.01 (ファミリーなし)	1 - 3